# *Determination of Disturbances in Regulatory T cells (T reg) and their Association with Febrile Infections in Childhood Leukemias*

**PROTOCOL OF THESIS**
**Submitted for Partial Fulfillment of Master Degree in Basic Science Medical Microbiology and Immunology**


Presented by

**Mona Adel Salah Khattab**
M.B.,B.Ch

Supervised by

**Dr.Nebal Medhat Darwish**
Assistant Professor of Microbiology and Immunology
Faculty of Medicine –Ain Shams University

**Dr.Riham Saher El Asady**
Lecturer of Microbiology and Immunology
Faculty of Medicine – Ain Shams University

**Dr. Ashraf Mahmoud Abdel Monem**
Lecturer of Pediatric Medicine
Faculty of Medicine – Ain Shams University



**Faculty of Medicine**
**Ain Shams University**

٢٠٠٦

## INTRODUCTION

Acute lymphoplastic leukemia (ALL) is the most common malignancy of the developmental age, comprising ٣٠٪ of all neoplastic diseases in childhood. It results from uncontrolled proliferation of lymphoid precursor cells in bone marrow (Robinson LL et al., ١٩٩٧). Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant hematopoietic disorder characterized by proliferation of immature myeloid precursors with considerable impairment of the immune system (Notter M et al ., ٢٠٠١).

Chemotherapy, which is the basic treatment in many neoplastic diseases, including leukemia, negatively influences the immunological system. It disturbs immune function and increases susceptibility to infectious diseases. Therapy commonly consists of initial therapy by induction of remission, consolidation and early intensification, prophylaxis of CNS and then maintenance of treatment (Van Gool SW et al .,٢٠٠٠). Among the most common symptoms in leukemic patients are infections. Fever accompanies neutropenia in hematological malignancy and may be the first and only sign of sepsis . The number of patients at risk of infection continues to grow as the intensity and duration of chemotherapy extends (De Lalla F ١٩٩٧).

Possible mechanisms of evading normal immune monitoring of leukemic cells have been suggested, including alterations in T lymphocyte apoptosis, secretion of cytokines and expression of adhesion or signaling molecules in T cells (Chen X et al .,٢٠٠٠). While many studies have delineated that several immune network disturbances lead to leukemia, nevertheless, many aspects remain obscure.

Regulatory T cells (T-regs), known to be CD٤+ CD٢٥+, are able to inhibit the function of effector T cells in a contact dependent and cytokine independent manner (Taams LS et al .,٢٠٠٢). However , the exact mechanism of action of T regs remains unknown. Although CD ٤+CD٢٥+ T regs function beneficially in vivo to protect against development of autoimmunity, they may impair anti-tumor immune responses. Indeed, they are directed at least partly against auto-antigens expressed by tumors. In fact, it has been reported that elimination or reduction of CD٤+CD٢٥+ T –regs can induce effective tumor immunity in non responding mice by activating tumor-specific cytotoxic T lymphocytes and non-specific cytotoxic T lymphokine activated killer (LAK), natural killer (NK) cells (Tanaka H et al ., ٢٠٠٢). In addition, increased population of T – regs has been observed in patients with ovarian cancer, breast cancer , gastrointestinal cancer and lymphoma (Marshall NA et al ., ٢٠٠٤). Furthermore, studies have revealed that the frequency of CD ٤+ CD ٢٥ high T –regs was increased in AML patients ( Wang X et al .,٢٠٠٥).

The observation that T- reg expansion is associated with many cancers , may indicate the involvement of T-regs in the mitigation of an effective immune response by suppression of T effector cell activity against cancerous cells. Indeed, depletion of T – regs has been shown to be associated with increased efficiency of immunotherapy in breast cancer patients (Kunston KL et al .,٢٠٠٦). It is also possible to speculate that the increased number of T – regs may be associated with a decreased ability of effector T cells to mount an effective immune response against invading pathogens, hence the occurrence of febrile infections.

Pathogens may also have evolved strategies to establish conditions favoring T –reg priming (manipulating the antigen- presenting cells), recruitment (triggering of

chemokines) and survival. Indeed T –reg are activated by infection (McKee ,A.S et al., ٢٠٠٤).

## AIM OF THE WORK

The aim of the work is to determine disturbances in T – reg numbers in patients with childhood leukemia, and to unveil any possible association between T-regs and occurrence of febrile infections in such patients. In addition we will determine the effect of treatment on T- reg numbers in patients of childhood leukemia.

## MATERIALS and METHODS

This is an active cross sectional study which will take place in Ain Shams University Hospital, Department of Pediatric Hematology.

## Patients and Controls :

This study will include ٥٠ samples from children diagnosed as childhood leukemia (ALL&AML) in different stages of disease, divided into two groups :
Group One :(٢٥ children) at the time of initial diagnosis.
Group Two :( the same ٢٥ children) after induction therapy.
Controls: ٢٠ healthy children.
For all cases the following will be performed:

## History :

For each patient a thorough history will be taken to cover the most common symptoms these patients present with as:
Fatigue, pallor, bleeding tendency ,weight loss, fever, dyspnea, bone pain.

**Routine investigations** will be done for leukemic children:

١- CBC.
٢- Bone marrow aspiration with immunophenotyping to determine the type of leukemia.
٣- Liver and kidney function tests.

**Antibodies and Flow Cytometric Analysis**:

Heparinized blood from leukemic patients and healthy controls will be stained with monoclonal antibodies: anti-CD ٤- FITC (fluorescein isothiocynate), anti-CD ٢٥-PE (phycoerythrin). Some tubes will be stained with isotype control antibodies. Flow cytometry will be performed on a FACS –Calibur with CellQuest soft ware.

**For leukemic patients who will develop febrile attacks:**

Fever is defined as either single temperature reading > ٣٨,٥ ºC or a persistent fever reading >٣٨ ºC on at least three consecutive evaluations within a ٢٤ hour period.

**Bacterial culture and Identification of organisms:**

Blood culture will be performed :
٢ ml heparinized blood will be inoculated into bottles containing ٢٠ ml infusion broth, followed by incubation at ٣٧ ºC.
Subculture on Blood Agar and MacConkey's agar medium will be performed.
Isolated organisms will be identified by the biochemical reaction profile and antibiotic sensitivity will be performed.

**References:**


١-Chen X , Wolciechowsky A . Raffegerst S .(٢٠٠٠):Impaired expression of the CD ٣-zeta chain in peripheral blood T cells of patients with chronic myeloid leukemia results in an increased susceptibility to apoptosis. Br J Hematol ;١١١:٨١٧-٨٢٥.

٢-De Lalla F.(١٩٩٧) :Antibiotic treatment of febrile episodes in neutropenic cancer patients.Drugs;٥٣:٧٨٩-٨٠٣.

٣-Kunston KL , Dang Y , Lu H, Lukas J , Almand B, Gad E, Azeke E, Disis ML .(٢٠٠٦) :IL -٢ Immunotoxin Therapy modulates tumor associated Regulatory T cells and leads to lasting immune- mediated rejection of Breast cancers in neu-Transgenic mice. J immunol;١٧٧(١):٨٤-٩١.

٤- Marshall NA, Christie LE .Munro LR . (٢٠٠٤): Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma .Blood;١٠٣:١٧٥٥-١٧٦٢.

٥-Mckee,AS &Pearce ,E.J.(٢٠٠٤):CD ٤+ CD٢٥+ cells contribute to Th٢ polarization during helminth infection by suppressing Th١ response development.J.immunol;١٧٣:١٢٢١-١٢٣١.

٦-Notter M, Willinger T, Erben U.(٢٠٠١):Targeting of a B ٧-١ (CD ٨٠) immunoglobulin G fusion protein to acute myeloid leukemia blasts increases their costimulatory activity for autologous remission T cells .Blood;٩٧:٣١٣٨-٣١٤٥.

٧-Robison LL , Piazzo PA ,Poplack DG .(١٩٩٧): General principles of the epidemiology of childhood cancer .Principles and practice of pediatric oncology:١-١٠.

٨-Taamas LS, Vukmanovic –Stejic M , Smith J .(٢٠٠٢):Antigen specific T cell suppression by human CD ٤+ CD٢٥+ regulatory T cells.Eur J immunol ;٣٢ :١٦٢١-١٦٣٠.

٩-Tanaka H , Tanaka J , Kajergaard J.(٢٠٠٢):Depletion of CD ٤+ CD٢٥+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor –draining lymph nodes.J immunother ;٢٥ :٢٠٧-٢١٧.

١٠-Van Gool SW , Van den Hove L,Ceuppens JL.(٢٠٠٠):Activation of the immune system in cancer patients. Med Pediatr Oncol ;٣٤ :١-٩.

١١-Wang X , Zheng J, Liu J, He Y, Li X ,Yang J , Liu Z ,Huang S.(٢٠٠٥):Increased population of CD ٤+ CD ٢٥ high regulatory T cells with their higher apoptotic and proliferation status in peripheral blood of acute myeloid leukemia patients.Eur J Hematol ;٧٥ :٤٦٨-٤٧٦.

# دراسة اضطرابات الخلايا التائية التنظمية
# ومدي ارتباطها بحدوث عدوى حموية فى سرطان دم الاطفال

رسالة
لنيل درجة الماجستير
فى العلوم الطبية الاساسية
(الكائنات الدقيقة و المناعة)

مقدمة من

**طبيبة/ منى عادل صلاح خطاب**
بكالريوس الطب و الجراحة

تحت اشراف:

**د/ نبال مدحت درويش**
استاذ مساعد الكائنات الدقيقة و المناعة
كلية الطب - جامعة عين شمس

**د/ ريهام ساهر الاسدى**
مدرس الكائنات الدقيقة و المناعة
كلية الطب - جامعة عين شمس

**د/اشرف محمود عبد المنعم**
مدرس طب الاطفال
كلية الطب - جامعة عين شمس

كلية الطب
جامعة عين شمس
٢٠٠٦

## مقدمة:

يعتبر سرطان الدم الليمفاوى الحاد هو اكثر الاورام شيوعا فى الاطفال ,يمثل حوالى ٣٠% من كل السرطانات فى مرحلة الطفولة .ينتج من تكاثر غير محكم فى الخلايا الليمفاوية السالفة فى نقى العظم.يعتبر سرطان الدم النقوى الحاد هو خلل سرطانى فى مكون الدم ,يتميز بتكاثر الخلايا السالفة النخاعية الغير ناضجة مع وجود تدهور ملحوظ فى الجهاز المناعى. تؤثر المعالجة الكيميائية سلبيا على الجهاز المناعى ,و هى تعتبر العلاج الرئيسى لمعظم الاورام.تحدث خلل فى الوظائف المناعية ,وتزيد احتمالية الاصابة يالامراض المعدية.يتكون العلاج من معالجة اولية ,تشمل التحريض على حدوث هداة ,اندمال,وحدوث تظاهرة اولية,ووقاية الجهاز العصبى,ثم بعد ذلك حدوث مداومة للعلاج.من الاعراض الشائعة فى سرطان الدم هى العدوى.الحمى التى تصاحب قلة العدلات ممكن ان تكون الاشارة الاولى و الوحيدة فى الانتنان.يزيد عدد المرضى المحتمل اصابتهم بالعدوى كلما زادت مدة العلاج.

تم اقتراح بعض الاساليب التي تساعد على خلق مراقبةمناعية طبيعية
لخلايا سرطان الدم تشمل تغيرات فى استماتة الخلايا الليمفاوية التائية ,افراز السيتوكين ,توضيح جزيئات الالتصاق على الخلايا الليمفاوية التائية.اوضحت بعض الدراسات ان اضطرابات فى الجهاز المناعى تؤدى الى سرطان الدم ,ولكن تظل بعض الامور غامضة.

الخلايا التائية التنظمية قادرة على تثبيط وظيفة الخلايا التائية المستقلة ,باسلوب معتمد على الالتماس و غير معتمد علي السيتوكين.على الرغم من هذا طريقة عمل الخلابا التائية التنظمية غير معروف بالضبط الى الان.على الرغم من ان الخلايا التائية التنظمية سى دى ٤+ سى دى ٢٥+ تعمل بكفاءة داخل الجسم للحماية من حدوث مرض مناعة ذاتية.الا أنها ممكن أن تعوق الأستجابة المناعية ضد الأورام . في الواقع أنها موجهة علي الأقل ضد المستضد الذاتي الموضح علي الخلية الورمية . في الواقع أنه تم الأستدلال علي أنه في حالة وجود نقص من الخلايا التائية التنظمية سى دى ٤+ سى دى ٢٥+ي يمكن ان يؤدى حدوث استجابة فعالة فى فئران غير مستجبين مناعيا,عن طريق تنشيط الخلايا الليمفاوية السامة للخلايا , و الخلايا الفاتكة المنشطة بالليمفوكين ,و الخلايا الفاتكة الطبيعية.تم ملاحظة زيادة الخلايا التائية التنظمية فى مرضى سرطان الثدى, سرطان المبيض , السرطان المعوى , و ورم ليمفومة . كما اوضحت بعض الدراسات زيادة نسبة سى دى ٤+ سى دى ٢٥ + فى مرضى سرطان الدم النقوى.

قد لوحظ في بعض الدراسات أنه هناك زيادة في الخلايا التائية التنظيمية في كثير من الأورام وهذا يمكن أن يشير الي أن مشاركة الخلايا التائية التنظيمية في وجود استجابة مناعية فعالة عن طريق تثبيط الخلايا التائية المستفعلة

ضد بعض الخلايا السرطانية . في الواقع قد لوحظ أنه عند التخلص من الخلايا التائية التنظيمية فهذا مرتبط بزيادة الكفائة في المعالجة المناعية ضد سرطان الثدي . من التوقع بأن زيادة عدد الخلايا التائية التنظيمية يكون مرتبط بنقص قدرة الخلايا التائية المستفعلة في ارساء استجابة مناعية فعالة ضد الممرضات وهنا تحدث من حموية .

يمكن للممرضات أن توفر ظروف ملائمة للخلايا التائية التنظيمية في صورة تداول الخلايا المقدمة للمستضد وتحفيز المنشطات الكيميائية . تنشط الخلايا التائية التنظيمية بالعدوي .

## **الهدف من الدراسة**:

الهدف من الدراسة هو تحديد الأضطرابات في عدد الخلايا التنظيمية في الأطفال المصابون بسرطان الدم وايضاح أي ارتباط بين اضطرابات في الخلايا التائية التنظيمية وحدوث عدوي حموية في هؤلاء المرضي . بالأضافة الي تحديد تأثير العلاج علي عدد الخلايا التائية التنظيمية في مرضي سرطان الدم .

**الحالات وطرق عمل الدراسة:**

هي دراسة مقطعية فعالة سيتم تطبيقها في قسم الأطفال وحدة أمراض الدم بمستشفي عين شمس الجامعي .

**المرضي :**

سوف تشمل ٥٠ عينه من اطفال تم تشخيصهم بأنهم مصابون بسرطان الدم ويتم تقسيمهم الي مجموعتين :

١- المجموعة الأولي : ٢٥ طفلا عند التشخيص
٢- المجموعة الثانية :نفس ٢٥ طفلا بعد مرحلة البدء في العلاج
و٢٠ طفلا طبيعيا كشريحة يتم المقارنة بها

وسوف يتم عمل الأتي :

السؤال عن تاريخ امرض : سوف يتم السؤال عن أكثر الأعراض شيوعا بين هؤلاء المرضي مثل : الشحوب, فقدان الوزن , الحمي

**التحاليل الروتينية المتبع اجرائها لمرضي سرطان الدم :**

١- صورة دم كامل
٢- خزعة من النخاع العظمي لدراسة النمط الظاهري المناعي
٣- اختبارات وظائف الكبد والكلي

**الاجسام المضادة , و التحليل بالفلوسيتوميتر:**

سوف يتم صبغ دم المرضى المضاف اليه هيبارين بأجسام مضادة وحيدة النسيلة ضد سي دي ٤ وسي دي ٢٥

**في حالة وجود عدوي حموية في الأطفال المصابون بسرطان الدم :**

هنا تعرف الحمي علي أنه ارتفاع في درجة الحرارة >٣٨,٥ درجة مئوية أو استمرار ارتفاع في درجة الحرارة >٣٨ درجة مئوية خلال ٢٤ ساعة

**عمل مزارع للكائنات الدقيقة والتعرف عليها :**

عمل مزارع دم فى زجاجات مزارع الدم .
ثم عمل مزرعة ثانوية علي آجار دم وآجار ماكونكي .
التعرف علي الكائنات الدقيقة المعزولة وعمل اختبارات حساسية للمضادات الحيوية للأنواع المعزولة من الكائنات الحية الدقيقة.

## List of Abbreviations

| | | |
|---|---|---|
| ALL | = | Acute Lymphoblastic Leukemia |
| AML | = | Acute Myeloid Leukemia |
| APCs | = | Antigen Presenting Cells |
| CBC | = | Complete blood count |
| CD | = | Cluster of differentiation |
| CD ٦٢ L | = | CD ٦٢ ligand |
| CNS | = | Central nervous system |
| CSF | = | Cerebrospinal fluid |
| CTL | = | Cytotoxic T lymphocytes |
| CTLA-٤ | = | Cytotoxic T –lumphocyte antigen-٤ |
| DC | = | Dendritic cells |
| FITC | = | Flourescent isothiocynate |
| GITR | = | Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor |
| GVHD | = | Graft versus host disease |
| aGVHD | = | acute Graft versus host disease |
| cGVHD | = | chronic Graft versus host disease |
| GVL | = | Graft versus leukemia |
| HCT | = | Hematopoietic cell trasnsplantation |
| HIV | = | Human immunodeficiency virus |
| HLA | = | Human Leucocyte Antigen |
| i Treg | = | Inducible Regulatory T cells |
| IDO | = | Indoleamine ٢,٣ dioxygenase |
| Ig | = | Immunoglobulin |
| IL | = | Interleukin |
| LAG-٣ | = | Lymphocyte activation gene -٣ |
| LAP | = | Latency associated protein |
| LFA-١ | = | Lymphocyte function –associated antigen-١ |
| LPS | = | Lipopolysaccharide |
| LTBP | = | Latent complex TGF- β binding protein |
| mAb | = | Monoclonal antibodies |

## List of Abbreviations (Cont.)

| | | |
|---|---|---|
| MCA | = | Methylcholanthrene |
| MHC | = | Major histocompatibility complex |
| NK | = | Natural killer |
| NOD | = | Non-obese diabetic |
| nTreg | = | Natural Regulatory T cells |
| PBS | = | Phosphate buffer saline |
| PE | = | Phycoerthrin |
| pre- B cell | = | precursor B-cell lineage |
| PAMPs | = | Pathogen associated molecular patterns |
| RA | = | Rheumatoid arthritis |
| SCID | = | Severe combined immunodeficiency |
| SLE | = | Systemic lupus erythrematosus |
| TCR | = | Tcell antigen receptor |
| TGF-β | = | Transforming growth factor- β |
| TGF-BRII | = | TGF-β Receptor type II |
| Th١ | = | Type ١ helper |
| Th٢ | = | Type ٢ hrlper |
| TID | = | Type I diabetes |
| TIL | = | Tumor infiltrating lymphocyte |
| TLR | = | Toll Like Receptors |
| TNF-α | = | Tumor necrosis factor – α |
| Tr-١ | = | Tregulatory ١ cells |
| Tr-٢ | = | T regulatory- ٢ cells |
| Treg | = | Regulatory T cells |
| V.S | = | Very significant |
| WBC | = | White blood cells |

# List of Contents


| Contents | Page |
|---|---|
| **Introduction** | ١ |
| **Aim of the work** | ٢ |
| **Review of Literature** | ٣ |
| **I-Overview of T cells** | ٣ |
| **II- T cell Development** | ٦ |
| **III-Regulatory T-cells** | ٨ |
| a-Regulatory T cells subpopulations | ٨ |
| b-Naturally occurring Regulatory T cells | ٩ |
| i-Discovery | ٩ |
| ii-Development, Repertoire and Antigen specificity of nTreg | ٩ |
| iii-Phenotype of CD٤+CD٢٥+n T reg | ١٠ |
| iv-Role of n T-reg in maintaing self Tolerance | ١١ |
| v- CD ٤+ CD٢٥+nTreg cells mediated suppression | ١٢ |
| vi-Costimulatory molecules in nTreg cell Activation and Function: | ١٣ |
| *١-Role of CTLA- ٤ and CD ٢٨ / B٧ in activation of T reg* | ١٣ |
| *٢-Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor (GITR):* | ١٦ |
| *٣-Role OF Toll Like Receptors ( TLR) in T reg* | ١٦ |
| c-InducibleRegulatoryTcells : | ١٧ |
| i-Overview: | ١٧ |
| ii-Generation of iTreg: | ١٧ |
| *١-Role of IL-١٠ in generation of iTreg:* | ١٨ |
| *٢-Role of TGF β in generation of iTreg:* | ١٨ |
| d-Mechanism of T reg suppression | ١٨ |
| i-Cell to cell contact –dependent suppression( Cytokine independent): | ١٩ |
| ii-Cytokiine-dependent suppression: | ٢١ |
| iii-Cytotoxicity: | ٢٢ |
| e-Control of Treg –mediated suppression: | ٢٤ |
| i-TCR signals,costimulation and cytokines: | ٢٤ |
| ii- GITR: | ٢٥ |
| iii- Toll like receptors and inflammation: | ٢٥ |

## List of Contents (Cont.)


**IV-Overview of TGF-β expression,signaling, and role in Treg function:** ٢٥

a-Role Of TGF- β in immune responses: ٢٥

b-TGF –β expression and activation : ٢٦

c-TGF – β Receptors and signaling : ٢٧

d- Effect of TGF- β on regulation of T reg : ٢٨

**V-Regulatory T cells in disease:** ٢٩

a-Treg and allergy: ٢٩

Regulatory T cells and allergen immunotherapy: ٣١

b-T reg and hematopoietic cell transplantation : ٣٢

c-Treg and autoimmune diseases ٣٤

d-Treg and tumor immunity ٣٦

i-Tumor Evasion of the immune system: ٣٨

ii-Depletion or functional inactivation of Treg cells in tumor immunity ٣٩

*١-Elimination of CD٤+CD٢٥+Treg:* ٣٩

*٢-Blockade of CTLA-٤ :* ٤٠

*٣- Blockade of GITR:* ٤٠

iii-Immunotherapeutic trials aiming to cure different types of tumors by depleting Treg ٤٠

*١- T cell acute lymphoblastic leukemia in mice:* ٤٠

*٢- Breast cancer in mice:* ٤١

*٣- Murine Melanoma:* ٤١

e-Treg and infection: ٤١

i-Impact of pathogens on regulatory T cells: ٤٢

ii-Manipulation of Treg as a therapeutic approach during infection: ٤٣

*١- Treg depletion:* ٤٤

*٢-Treg expansion or activation:* ٤٤

**VI- Therapeutic interventions to enhance Treg in vivo:** ٤٥

**Acute lymphoblastic leukemia**

**i**-Introduction: ٤٦

ii-Pathophysiology: ٤٦

iii- Immunophenotyping ٤٦